

На правах рукописи

РЫБАКОВА СНЕЖАНА РАФАИЛОВНА

Циклоспорин А-чувствительное, кальций-независимое разобщающее действие
жирных кислот в митохондриях печени крыс

03.01.04 — биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Казань 2013

Работа выполнена на кафедре биохимии и физиологии и в лаборатории молекулярной биоэнергетики ФГБОУ ВПО «Марийский государственный университет» (г. Йошкар-Ола)

Научный руководитель: Самарцев Виктор Николаевич,
доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: Минибаева Фарида Вильевна, доктор
биологических наук, заведующая лабораторией
окислительно-восстановительного метаболизма
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Казанский институт биохимии и биофизики» Казанского научного центра РАН

Амерханов Зариф Гариевич, кандидат
биологических наук, старший научный сотрудник
лаборатории механизмов природных гипометаболических состояний Института биофизики клетки РАН (г. Пущино) учреждения РАН

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Защита диссертации состоится «14» ноября 2013 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.081.08 ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке им. Н.И. Лобачевского при ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» по адресу: 420008, г. Казань, ул. Кремлевская, 35.

Автореферат разослан «___» _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, доктор
биологических наук, профессор

Абрамова Зинаида Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В клетках печени от 20 до 30% потребления кислорода митохондриями не связано с синтезом АТФ (Rolfe and Brand, 1997). Такое, так называемое, свободное окисление имеет важное физиологическое значение (Skulachev, 1998; Echtaу, 2007). Одним из основных механизмов свободного окисления в митохондриях является пассивная утечка протонов через внутреннюю мембрану митохондрий, которая может быть усилена с помощью природных протонофорных разобщителей окислительного фосфорилирования свободных монокарбоновых жирных кислот (Skulachev, 1998). В митохондриях печени протонофорное разобщающее действие жирных кислот почти на 80% осуществляется при участии белков-переносчиков внутренней мембраны ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров (Skulachev, 1998; Самарцев и др., 2011). Все еще не ясно, чем обусловлена оставшаяся часть разобщающей активности жирных кислот.

Естественными метаболитами монокарбоновых жирных кислот являются α,ω -диоловые (α,ω -дикарбоновые) кислоты, образующиеся в клетках печени путем ω -окисления их монокарбоновых аналогов (Ferdinandusse et al., 2004; Wanders et al., 2011). Показано, что одна из таких кислот – α,ω -тетрадекандиоловая, стимулирует дыхание митохондрий печени без снижения мембранного потенциала (Маркова и др., 1999). Необходимо проведение дальнейших исследований, направленных на выяснение механизма разобщающего действия как монокарбоновых жирных кислот, так и α,ω -диоловых кислот.

В качестве возможного инструмента для исследования действия жирных кислот наше внимание привлёк циклоспорин А, нейтральный липофильный циклический ундеканпептид, хорошо известный как эффективный иммуносупрессор (Schreiber and Crabtree G.R., 1992; Mathieson, 2000). В митохондриях печени циклоспорин А связывается с высоким сродством с пептидил-пролил *цис-транс* изомеразой (циклофилин D) и препятствует индукции кальций-зависимой неспецифической проницаемости внутренней мембраны митохондрий (открытие поры) уже при его концентрации 150 – 300 нМ (Halestrap and Davidson, 1990; Andreeva and Crompton, 1994). Вместе с тем остается не известным, как влияет циклоспорин А в более высокой концентрации (5 – 10 мкМ) на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени. Можно предположить, что циклоспорин А, будучи нейтральным липофильным соединением, но в то же время имея способные формировать водородные связи полярные группы, в высокой концентрации мог бы оказывать влияние на разобщающее действие свободных моно- и дикарбоновых жирных кислот.

Митохондрии печени месячных крысят массой 50 г. по сравнению с митохондриями печени взрослых крыс массой 250 г. имеют более высокую скорость дыхания как в контролируемом состоянии, так и в присутствии пальмитиновой кислоты (Самарцев и др., 2004). Представляет интерес выяснить как влияет циклоспорин А на ра-

зобобщающее действие жирных кислот в митохондриях печени крыс различного возраста.

Цель работы: выяснение механизма циклоспорин А-чувствительного, кальций-независимого разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени крыс. Для достижения этой цели необходимо было решить следующие задачи.

1. Выявить влияние циклоспорина А в концентрации 5-10 мкМ на показатели дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени крыс.
2. Исследовать действие циклоспорина А (5-10 мкМ) на стимулированное пальмитиновой и лауриновой кислотами дыхание митохондрий печени крыс.
3. Определить влияние циклоспорина А в концентрации 5-10 мкМ на сниженный жирными кислотами мембранный потенциал митохондрий печени крыс.
4. Исследовать влияние α,ω -тетрадекандиоловой кислоты на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени крыс в отсутствии и присутствии циклоспорина А.
5. Сравнить влияние циклоспорина А в эффективной концентрации на стимулированное пальмитиновой кислотой дыхание митохондрий печени крыс разного возраста.

Научная новизна работы. Впервые проведено комплексное исследование влияния циклоспорина А в различных и в особенности в высоких для его применения концентрациях на показатели дыхания и окислительного синтеза АТФ митохондрий печени крыс как в отсутствии, так и в присутствии природных разобщителей окислительного фосфорилирования свободных моно- и дикарбоновых жирных кислот. Показано, что в концентрации вплоть до 10 мкМ циклоспорин А не оказывает влияния на дыхание митохондрий печени в состояниях 2 и 4, а также при условии максимальной стимуляции дыхания 2,4-динитрофенолом. В этой же концентрации циклоспорин А вызывает небольшое снижение скорости дыхания в состоянии 3 и скорости фосфорилирования ADP (окислительного синтеза АТФ). Впервые установлено, что в концентрации 5 – 10 мкМ циклоспорин А в митохондриях печени способен ингибировать разобщающее действие пальмитиновой и лауриновой кислот как в отсутствие, так и в присутствии карбоксиатрактилата и глутамата (или аспартата) и такое его действие не сопровождается повышением мембранного потенциала. В такой же высокой концентрации циклоспорин А полностью устраняет способность α,ω -тетрадекандиоловой кислоты обратимо стимулировать дыхание митохондрий печени в отсутствие синтеза АТФ. На основании полученных результатов сформулирована оригинальная гипотеза о том, что в митохондриях печени крыс составляющая разобщающего действия монокарбоновых жирных кислот, чувствительная к циклоспорину А, и разобщающее действие α,ω -диоловых кислот осуществляется по одному и тому же механизму внутрен-

него разобщения. Впервые показано, что способность пальмитиновой кислоты стимулировать дыхание митохондрий печени крыс по механизму внутреннего разобщения зависит от возраста этих животных – больше в митохондриях крысят, чем взрослых крыс.

Научно-практическое значение работы. Полученные при выполнении диссертационной работы научные результаты имеют, прежде всего, фундаментальное биологическое значение. Они расширяют и углубляют представления о механизмах регуляции свободного окисления в митохондриях животных. Результаты диссертационного исследования могут быть использованы в фундаментальных исследованиях в области биохимии, биофизики, биоэнергетики, а также в области экспериментальной медицины. Новые знания, полученные при выполнении диссертации, в перспективе могут быть использованы для разработки методов и средств управления термогенезом у млекопитающих путем изменения активности свободного окисления в митохондриях.

Основные научные положения, выносимые на защиту.

1. В митохондриях печени животных составляющая часть разобщающей активности монокарбоновых жирных кислот, не связанная с функционированием ADP/ATP- аспартат/глутаматного антипортеров, и разобщающая активность α,ω -дикарбоновых кислот осуществляется по одному и тому же механизму внутреннего разобщения.
2. Циклоспорин А в концентрации 10 мкМ может быть использован как инструмент для оценки степени индукции моно- и α,ω -дикарбоновыми жирными кислотами внутреннего разобщения в митохондриях печени животных.
3. Активность пальмитиновой кислоты как индуктора свободного окисления в митохондриях печени крыс по механизму внутреннего разобщения зависит от возраста этих животных.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были доложены на международной конференции «Рецепция и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2009 г.); на первой международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2010 г.); на 15-ой и 16-ой Международных Пушинских школах-конференциях молодых ученых (Пушино, 2011 и 2012 г.); на международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2011 г.); на Международной конференции молодых ученых 22-24 октября 2012 г. «Экспериментальная и теоретическая биофизика '12» (Пушино, 2012 г.); на I Всероссийской интернет-конференции «Современные проблемы биохимии и бионанотехнологии» (Казань,

2010 г.); на тринадцатой постоянно действующей Всероссийской междисциплинарной научной конференции с международным участием «Глобализация. Глобалистика. Потенциалы и перспективы России в глобальном мире» (Йошкар-Ола 2010 г.); на Всероссийской конференции «Актуальные проблемы экологии, биологии и химии» (Йошкар-Ола 2010 г.); на IV съезде биофизиков России 20-26 августа 2012 г. (Нижний Новгород, 2012 г.).

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке аналитической ведомственной целевой программы «Развитие научного потенциала высшей школы (2009 – 2011 годы)» (№ 2.1.1/13090) и Федеральной целевой программы Министерства образования и науки Российской Федерации (соглашение 14.V37.21.0191).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 4 статьи в ведущих научных журналах, рекомендованных ВАК, и 11 статей, тезисов докладов региональных, всероссийских и международных научных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 129 страницах, включая список литературы, иллюстрационный материал включает 33 рисунка и 10 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. В работе были использованы белые беспородные крысы-самцы в возрасте 9 – 12 месяцев с массой тела 220 – 260 г и месячные крысята массой 50 г. Содержание, кормление и забой животных соответствовали необходимым требованиям, изложенным в соответствующем руководстве (Западнюк и др., 1983), а также международным правилам «Guide for the Care and Use of Animals» и правилам, утвержденным в системе Министерства высшего и среднего образования СССР (Приказ № 742 от 13 ноября 1984 г.).

Выделение митохондрий. Митохондрии из печени крыс выделяли общепринятым методом дифференциального центрифугирования с последующим удалением эндогенных жирных кислот с помощью БСА (Samartsev et al., 1997a). Среда выделения содержала 250 мМ сахарозу, 1 мМ EGTA и 5 мМ HEPES- трис (pH 7,4). Концентрацию белка митохондрий определяли биуретовым методом, в качестве стандарта использовали БСА.

Регистрация дыхания митохондрий. Дыхание митохондрий регистрировали при температуре 25°C с помощью кислородного электрода Кларка и полярографа LP-

9 и открытого кислородного электрода (Кондрашова и др., 1973). Концентрация белка митохондрий в кислородной ячейке $\sim 1,1 - 1,2$ мг/мл. Среда инкубации содержала 200 мМ сахарозу, 20 мМ KCl, 5 мМ янтарную кислоту, 0,5 мМ EGTA, 2 мМ $MgCl_2$, 10 мМ HEPES-трис (pH 7,4).

Оценка параметров окислительного фосфорилирования митохондрий. При исследовании окислительного фосфорилирования среда инкубации без олигомицина дополнительно содержала 5 мМ KH_2PO_4 (P_i) и БСА (0,2 мг/мл). Применяли следующие показатели дыхания и окислительного фосфорилирования: J_2 – скорость дыхания митохондрий в присутствии P_i до добавления ADP (состояние 2 по Чансу); J_3 – скорость дыхания митохондрий в присутствии P_i и ADP (состояние 3 по Чансу); J_4 – скорость дыхания митохондрий в присутствии P_i после того, как весь добавленный ADP был израсходован в процессе синтеза АТФ (состояние 4 по Чансу); RC – отношение величин J_3 и J_4 (дыхательный контроль по Чансу); J_u – скорость дыхания митохондрий в присутствии протонофорного разобщителя 2,4-динитрофенола в концентрации, вызывающей максимальную стимуляцию дыхания; ADP/O – стехиометрический коэффициент, показывающий эффективность окислительного фосфорилирования; J_p – скорость синтеза АТФ. Размерность величин J_2 , J_3 , J_4 и J_u – нмоль O_2 / мин на 1 мг белка; размерность величины J_p – нмоль ADP / мин на 1 мг белка; размерность величин RC и ADP/O – относительные единицы. Значение коэффициента ADP/O определяли пульсовым методом (Hinkle and Yu, 1979). Значение величины J_p определяли как удвоенное произведение величин J_3 и ADP/O .

Оценка разобщающей активности жирных кислот. Для количественной оценки разобщающей активности жирных кислот в соответствии с известной методикой (Самарцев и др., 2004), использовали величину стимуляции дыхания этой жирной кислотой (J_U), определяемую как разность между скоростью дыхания митохондрий (нмоль O_2 / мин на 1 мг белка) после и до добавления жирной кислоты. Величина J_U рассматривается как состоящая из трех частей – чувствительная к карбоксиатрактилату (J_C), чувствительная к глутамату (J_G) или к аспартату (J_A) и чувствительная к циклоспорину А (J_{CSA}). Величину J_C определяли как разность между скоростью дыхания митохондрий в присутствии жирной кислоты до и после добавления карбоксиатрактилата, а величину J_G – как разность между скоростью дыхания митохондрий в присутствии жирной кислоты и карбоксиатрактилата до и после добавления глутамата. Использовали также величину удельной разобщающей активности (V_U) и ее составляющие: чувствительную к карбоксиатрактилату (V_C), чувствительную к глутамату (V_G) и чувствительную к циклоспорину А (V_{CSA}). Величины V_U , V_C и V_G определяли как частное от деления величин J_U , J_C и J_G соответственно на концентрацию жирной кислоты. Ресопрягающие эффекты карбоксиатрактилата, глутамата или аспартата выражали в процентах и определяли как отношение величины ингибирования дыхания в присутствии жирной кислоты одним из этих ресопрягающих агентов к величине сти-

муляции дыхания этой жирной кислотой по формуле $100 \cdot \Delta J_u / (J_u - J_o)$, где J_u и J_o – скорости дыхания соответственно в присутствии и в отсутствии жирной кислоты, ΔJ_u – снижения скорости дыхания ресопрагающим агентом (Самарцев и Кожица, 2008).

Регистрация изменения разности электрических потенциалов ($\Delta\Psi$) на внутренней мембране митохондрий. Изменение $\Delta\Psi$ на внутренней мембране митохондрий оценивали по изменению концентрации ТФФ⁺ в среде инкубации с помощью ТФФ⁺-чувствительного электрода (Kamo et al., 1979) при 25°C при постоянном перемешивании в открытой ячейке объемом 2 мл. В этих экспериментах в среду инкубации дополнительно добавляли 1,6 мкМ ТФФ⁺.

Статистическая обработка результатов. Полученные данные были обработаны статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента с использованием пакета прикладных компьютерных программ «Statistica». Для оценки значимости различий использовали уровень вероятности $P < 0,05$.

Химические реактивы. В работе использовали HEPES, α,ω -тетрадекандиоловую кислоту (ТДК), олигомицин, янтарную кислоту, пальмитиновую и лауриновую кислоты, циклоспорин А, очищенный от жирных кислот БСА, карбоксиатрактитат, аспартат калия, глутамат калия, трис(оксиметил)аминометан, хлорид тетрафенилфосфония ("Sigma", США), ротенон, EGTA ("Serva", Германия), ADP, 2,4-динитрофенол, KCl ("Fluka" Швейцария), KH_2PO_4 , MgCl_2 ("Merck", Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Влияние циклоспорина А на показатели дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий печени

В состоянии 2, т.е. при условии отсутствия синтеза АТФ и без разобщителей, митохондрии потребляют кислород с небольшой скоростью, а циклоспорин А даже в концентрации 10 мкМ не оказывает какого-либо существенного влияния на скорость дыхания (рис. 1, кривая *а*). Классический протонофорный разобщитель ФКФ, будучи добавленный к митохондриям печени в концентрации 60 нМ, стимулирует дыхание в 2 раза, и при этих условиях циклоспорин А также не эффективен (рис. 1, кривая *б*).

Как показано в таблице 1, циклоспорин А в концентрации 10 мкМ не оказывает влияния на скорости дыхания в состоянии 2 (J_2), в состоянии 4 (J_4), а также на скорость дыхания при максимальном разобщающем действии 50 мкМ 2,4-динитрофенола (J_u), но снижает как скорость дыхания в состоянии 3 (J_2), так и скорость фосфорилирования ADP (J_P) на 18% (таблица 1). Вместе с тем при этих условиях циклоспорин А не оказывает влияния на характеризующие эффективность окислительного фосфорилирования коэффициенты RC и ADP/O (таблица 1).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что циклоспорин А в концентрации 10 мкМ, т.е. в значительно большей, чем та в которых он обычно применяется для подавления индукции неспецифической проницаемости внутренней

мембраны митохондрий (Halestrap and Davidson, 1990; McGuinness et al., 1990; Andreeva and Crompton, 1994), не оказывает влияния на дыхание митохондрий печени в состояниях 2 и 4, а также при условии максимальной стимуляции дыхания 2,4-динитрофенолом. В этой же концентрации циклоспорин А вызывает небольшое снижение скорости дыхания в состоянии 3 (J_3), и скорости фосфорилирования ADP, что, по-видимому, связано с влиянием этого пептида непосредственно на систему синтеза АТФ (F_0F_1 -АТФ-синтаза) и (или) на обменный транспорт ADP на АТФ через внутреннюю мембрану митохондрий.

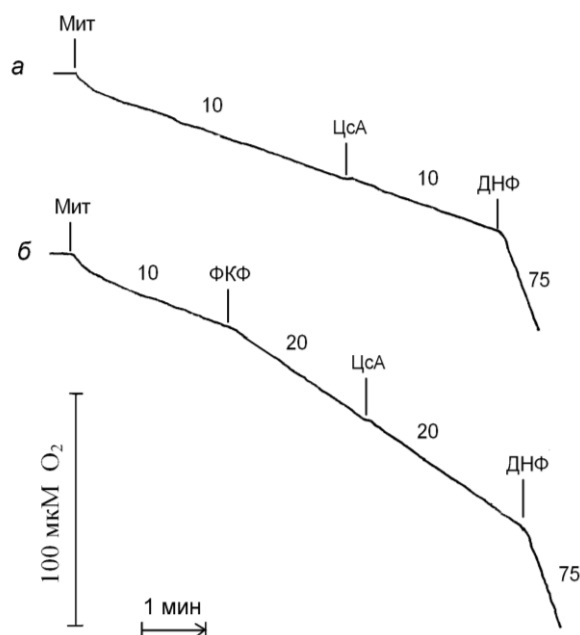


Рис. 1. Отсутствие влияния циклоспорина А на дыхание митохондрий печени в состоянии 2 (а) и при условии стимуляции дыхания ФКФ в 2 раза (б). Условия опыта и состав среды инкубации описаны в экспериментальной части, среда инкубации дополнительно содержала БСА (0,2 мг/мл). Мит – митохондрии печени (1 мг/мл), ЦсА – 10 мкМ циклоспорина А, ФКФ – 60 нМ, ДНФ – 50 мкМ 2,4-динитрофенола. Цифры у кривых – скорость потребления кислорода, нмоль O_2 / мин на 1 мг белка.

Таблица 1 - Влияние циклоспорина А на дыхание и окислительное фосфорилирование митохондрий печени

Показатели скорости дыхания и синтеза АТФ	Контроль	Циклоспорин А (10 мкМ)
J_2 (нмоль O_2 /мин на 1 мг белка)	$10,5 \pm 0,7$	$9,6 \pm 0,7$
J_3 (нмоль O_2 /мин на 1 мг белка)	$53,8 \pm 1,6$	$43,9 \pm 2,7^*$
J_4 (нмоль O_2 /мин на 1 мг белка)	$12,0 \pm 0,9$	$11,0 \pm 1,5$
J_u (нмоль O_2 /мин на 1 мг белка)	$79,6 \pm 1,8$	$74,5 \pm 5,4$
J_p (нмоль ADP / мин на 1 мг белка)	$196,3 \pm 2,5$	$160,3 \pm 11,5^*$
RC (отн. ед.)	$4,44 \pm 0,28$	$4,15 \pm 0,31$
ADP/O (отн. ед.)	$1,83 \pm 0,04$	$1,83 \pm 0,03$

Примечание. Условия опыта, состав среды инкубации и размерность применяемых величин приведены в разделе «Материалы и методы» и на рис. 4. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4$).

* Различия между опытом (присутствие циклоспорина А) и контролем (его отсутствие) статистически значимы, $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

3.2. Действие циклоспорина А в различных концентрациях на стимулированное пальмитиновой и лауриновой кислотами дыхание митохондрий печени

На рис. 2 приведены данные сравнительных исследований разобщающего действия пальмитиновой кислоты в концентрации 30 мкМ при температуре 25°C и 37°C. Как видно из рис. 2 пальмитиновая кислота в концентрации 30 мкМ стимулирует дыхание митохондрий приблизительно в равной степени (в 2,7 раза) как при температуре 25°C, так и при температуре 37°C. Последующее добавление карбоксиатрактилата и глутамата приводит к частичному ингибированию дыхания, что свидетельствует об их способности подавлять разобщающее действие жирных кислот, т.е. о ресопрягающем действии (Samartsev et al., 1997a; 1997b; Самарцев и др., 2011). Добавление циклоспорина А в концентрации 10 мкМ после глутамата приводит к полному подавлению разобщающего действия пальмитиновой кислоты как при температуре 25°C, так и при температуре 37°C (рис. 2).

Для количественной оценки степени участия ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров в разобщающем действии жирных применялись величины ресопрягающих эффектов карбоксиатрактилата и глутамата (или аспартата) соответственно (Samartsev et al., 1997b; Самарцев и др., 1999). Установлено, что ресопрягающие эффекты карбоксиатрактилата, глутамата и циклоспорина А одинаковы как при температуре 25°C, так и при температуре 37°C. все последующие эксперименты были проведены при температуре 25°C.

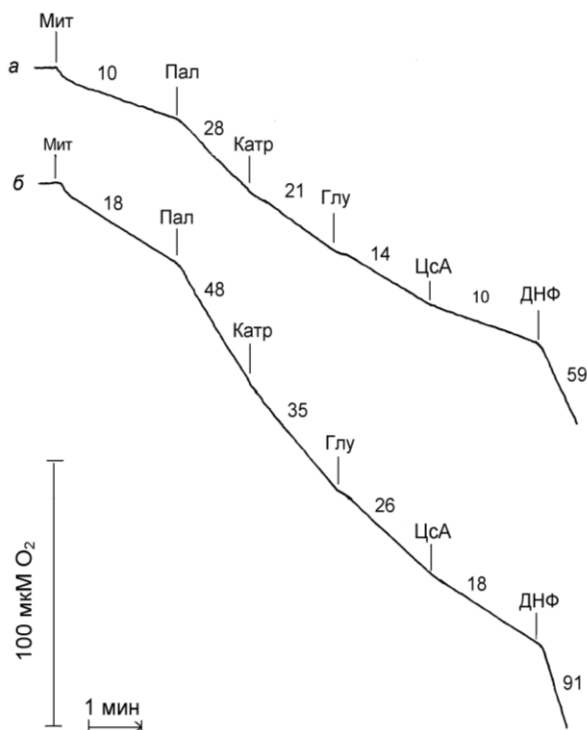


Рис. 2. Влияние карбоксиатрактилата, глутамата и циклоспорина А на стимулированное пальмитиновой кислотой дыхание митохондрий печени при температурах 25°C (а) и 37°C (б). Условия опыта и состав среды инкубации описаны в экспериментальной части. Мит – митохондрии печени (1 мг/мл), Пал – 30 мкМ пальмитиновой кислоты, Катр – 1 мкМ карбоксиатрактилата, Глу – 2 мМ глутамата калия, ЦсА – 10 мкМ циклоспорина А, ДНФ – 50 мкМ 2,4-динитрофенола. Цифры у кривых – скорость потребления кислорода, нмоль O₂ / мин на 1 мг белка.

В следующих экспериментах (таблица 2) циклоспорин А был внесен в ячейку сразу после добавления митохондрий. Как видно из таблицы, если в отсутствии циклоспорина А пальмитиновая кислота в концентрации 30 мкМ стимулирует дыхание митохондрий в 2,36 раза, то в присутствии – в 2,09 раза. При этом в присутствии цик-

лоспорина А карбоксиатрактилата и глутамата способны полностью подавлять стимулированное пальмитиновой кислотой дыхание (таблица 2).

Таблица 2 — Ингибирование карбоксиатрактилата и аспартата стимулированного пальмитатом дыхания митохондрий печени крыс в отсутствии (контроль) и присутствии циклоспорина А

Добавки	Скорость дыхания, нмоль O ₂ /мин на 1 мг белка	
	Контроль (<i>n</i> = 4)	Циклоспорин А (<i>n</i> = 4)
Без добавок	11,1 ± 0,5	10,9 ± 0,4
Пал	25,3 ± 1,2	22,6 ± 1,1
Пал + Катр	19,1 ± 0,6	16,3 ± 0,5*
Пал + Катр + Асп	13,9 ± 0,4	11,2 ± 0,4*
Пал + Катр + Асп + ДНФ	78,2 ± 3,6	77,6 ± 3,4

Примечание. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в экспериментальной части и на рис. 5. Пал – 30 мкМ пальмитиновой кислоты, Катр – 1 мкМ карбоксиатрактилата, Асп – 3 мМ аспартата калия, 10 мкМ циклоспорина А, ДНФ – 50 мкМ 2,4-динитрофенола. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего.

* Различия между опытом (присутствие циклоспорина А) и контролем (его отсутствие) статистически значимы, *p* < 0,05 (критерий Стьюдента).

Циклоспорин А существенно уменьшает разобщающую активность пальмитиновой кислоты, но при этом не влияет на составляющие разобщающей активности чувствительную к карбоксиатрактилату и чувствительную к аспартату. Следовательно, действие циклоспорина А не связано с его влиянием на ADP/АТФ- и аспарат/глутаматный антипортеры.

Циклоспорин А существенно уменьшает разобщающую активность лауриновой кислоты, но при этом не влияет на составляющие разобщающей активности чувствительную к карбоксиатрактилату и чувствительную к глутамату. Следовательно, и при разобщении лауриновой кислотой действие циклоспорина А не связано с его влиянием на ADP/АТФ- и аспарат/глутаматный антипортеры.

По аналогии с карбоксиатрактилатам и глутаматом способность циклоспорина А ингибировать разобщающее действие лауриновой кислоты также была выражена количественно как ресопрягающий эффект. При добавлении циклоспорина А после лауриновой кислоты, карбоксиатрактилата и глутамата его ресопрягающий эффект составляет 26,1 ± 1,0 % (*n* = 4), в отсутствие карбоксиатрактилата и глутамата – 27,0 ± 1,6 % (*n* = 4). Карбоксиатрактилата и глутамат не влияют на составляющую разобщающей активности, чувствительную к циклоспорину А (*J*_{CSA}).

На рис. 3 приведены результаты исследования зависимости ресопрягающего эффекта циклоспорина А от его концентрации. Как видно из рисунка 3, в низкой концентрации 0,5 и 1 мкМ циклоспорин А неэффективен и его ресопрягающий эффект проявляется только в концентрации 2 мкМ и выше, т.е. в существенно больше чем та,

в которой он эффективно ингибирует кальций-зависимую неспецифическую проницаемость внутренней мембраны митохондрий (Halestrap and Davidson, 1990; McGuinness et al., 1990; Andreeva and Crompton, 1994).

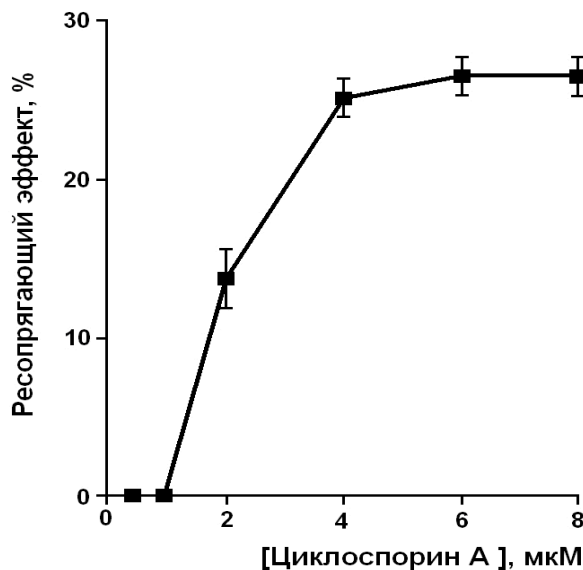


Рис. 3. Зависимость ресопрягающего эффекта циклоспорина А от его концентрации при разобщении митохондрий печени лауриновой кислотой в концентрации 30 мкМ. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в экспериментальной части и в примечании к таблице 3. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 4$).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что циклоспорин А ингибирует разобщающее действие пальмитиновой и лауриновой кислот как в присутствии, так и в отсутствие карбоксиатрактилата и глутамата. Очевидно, что наряду с ADP/ATP- и аспартат/глутаматным антипортерами существует третий, чувствительный к циклоспорину А, путь разобщающего действия жирных кислот, функционирующий независимо от первых двух. Установлено, что ресопрягающий эффект циклоспорина А проявляется в концентрации, которая значительно больше той, в которой он эффективно ингибирует кальций-зависимую неспецифическую проницаемость внутренней мембраны митохондрий. По-видимому, способность циклоспорина А ингибировать разобщающее действие жирных кислот не связана с его специфическим взаимодействием с циклофилином D.

3.3. Влияние циклоспорина А на разность электрических потенциалов на внутренней мембране митохондрий печени

Опыты с измерением разности электрических потенциалов ($\Delta\Psi$) на внутренней мембране митохондрий с помощью ТФФ-селективного электрода нередко проводятся в присутствии нигерицина, который, как известно, способен превращать ΔpH в $\Delta\Psi$ (Скулачев, 1989; Samartsev et al., 1997a; 2000). Это необходимо для устранения возможных артефактов, связанных с изменением $\Delta\Psi$ в присутствии пальмитиновой и лауриновой кислот. Концентрация применяемого в настоящей работе нигерицина 20 нМ является оптимальной, поскольку дальнейшее её увеличение не приводит к повышению $\Delta\Psi$ (Samartsev et al., 1997; 2000). Установлено, что в этой концентрации нигерицин уменьшает ресопрягающие эффекты карбоксиатрактилата и аспартата, но увеличивает ресопрягающий эффект циклоспорина А. Эти и другие данные свиде-

тельствуют о том, что вызванное нигерицином превращение ΔpH в $\Delta \Psi$ приводит к ингибированию разобщающей активности пальмитиновой кислоты при участии ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров и одновременно к увеличению разобщающей активности этой жирной кислоты при участии структуры, чувствительной к циклоспорино А.

Как видно из рисунка 4, добавление нигерицина к митохондриям приводит к повышению $\Delta \Psi$, а последующее добавление пальмитиновой кислоты – к снижению $\Delta \Psi$. Добавление карбоксиатрактилата и глутамата приводит к повышению $\Delta \Psi$ (ресопрягающий эффект), что хорошо согласуется с известными данными (Samartsev et al., 1997a). Совместное ресопрягающее действие карбоксиатрактилата и глутамата приводит к полному восстановлению $\Delta \Psi$, в этом случае циклоспорин А обладает слабым эффектом на $\Delta \Psi$ (рис. 4).

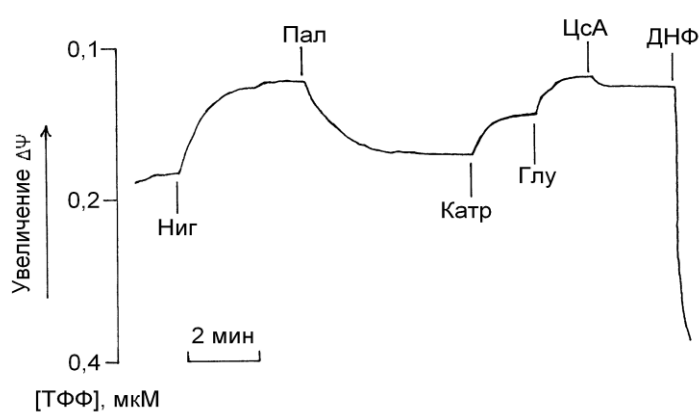


Рис. 4. Влияние карбоксиатрактилата (Катр), глутамата (Глу) и циклоспорина А (ЦсА) на $\Delta \Psi$ митохондрий печени в присутствии нигерицина (Ниг) и пальмитиновой кислоты (Пал). Условия опыта и состав среды инкубации описаны в экспериментальной части и в примечании к таблице 4. Среда инкубации была дополнена 1,6 мкМ хлоридом тетрафенилфосфония (ТФФ).

В отсутствие нигерицина внесение циклоспорина А к митохондриям после лауриновой кислоты приводит к снижению $\Delta \Psi$. Аналогичным образом действует циклоспорин А на $\Delta \Psi$ и в отсутствие жирных кислот. Полученные результаты свидетельствуют о том, что циклоспорин А не только не повышает $\Delta \Psi$, как следовало бы ожидать исходя из его действия на дыхание митохондрий печени как ресопрягающего агента, но даже понижает этот потенциал.

Таким образом, проведенные исследования показали, что в митохондриях печени разобщающее действие жирных кислот полностью подавляется при совместном действии карбоксиатрактилата, аспартата (или глутамата) и циклоспорина А. В отличие от карбоксиатрактилата и глутамата, циклоспорин А в указанной выше концентрации не влияет на мембранный потенциал митохондрий в присутствии жирных кислот. Полученные результаты позволяют предположить, что стимуляция дыхания митохондрий печени жирными кислотами обусловлена, помимо их протонофорного действия при участии ADP/ATP-антипортера и аспартат/глутаматного антипортера, еще и активацией транспорта электронов по дыхательной цепи без снижения мем-

бранного потенциала. Такой механизм активации свободного окисления в митохондриях известен под названием «внутреннее разобщение комплексов дыхательной цепи» (Van Dam et al., 1990; Papa et al., 2006).

3.4. Действие циклоспорина А на стимулированное α,ω -тетрадекандиоловой кислотой дыхание митохондрий печени

Известно, что α,ω -тетрадекандиоловая кислота (ТДК) стимулирует дыхание митохондрий печени без снижения мембранного потенциала, в то время как карбоксиатрактитат и глутамат не влияют на дыхание (Маркова и др., 1999). Как видно из рис. 5 (кривая *а*), ТДК в концентрации 400 мкМ увеличивает скорость дыхания митохондрий печени почти в 2 раза. Последующее добавление к митохондриям циклоспорина А в концентрации 10 мкМ приводит к ингибированию дыхания до исходного уровня. В том случае, если циклоспорин А был добавлен к митохондриям в начальный момент их инкубации, стимуляции дыхания ТДК не наблюдалось (кривая *б*). Эти данные получены при стандартной для биохимических исследований температуре 25°C. Аналогичные результаты получены при температуре 37°C (кривые *в* и *г*). Во всех случаях последующее добавление протонифицирующего разобщителя 2,4-динитрофенола в оптимальной концентрации 50 мкМ приводит к стимуляции дыхания приблизительно в 7 раз (рис. 5). Полученные результаты подтверждают известные ранее данные о способности ТДК активировать свободное окисление в митохондриях печени (Маркова и др., 1999). Новым является то, что стимулирующее действие этой жирной кислоты практически полностью устраняется циклоспорином А.

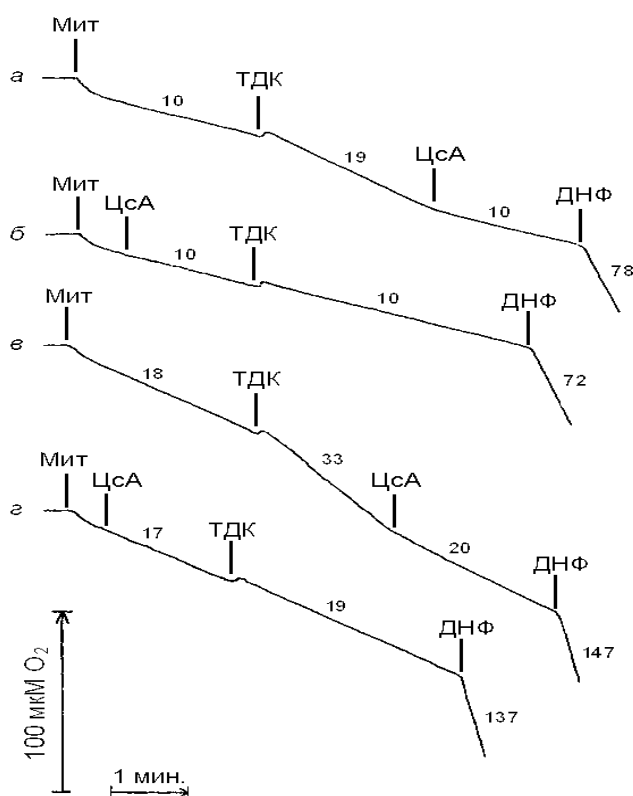


Рис. 5. Сравнение действия на дыхание митохондрий печени циклоспорина А при добавлении его до (кривые *а* и *в*) и после (кривые *б* и *г*) ТДК при температуре 25°C (кривые *а* и *б*) и 37°C (кривые *в* и *г*). Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы». Мит – митохондрии (1 мг/мл); ЦсА – циклоспорин А, 10 мкМ; ТДК, 400 мкМ; ДНФ – 2,4-динитрофенол, 50 мкМ. Цифры у кривых – скорость потребления кислорода, нмоль O₂/мин на 1 мг белка.

ТДК в концентрации 400 мкМ не влияет на дыхание митохондрий в состоянии 3 и в разобленном состоянии, но увеличивает скорость дыхания в состоянии 2 – на 68% и в состоянии 4 – на 84%. При этих условиях ТДК существенно уменьшает коэффициент дыхательного контроля, но не влияет на скорость окислительного синтеза АТР и коэффициент ADP/O . Полученные данные свидетельствуют о том, что ТДК эффективно стимулирует дыхание митохондрий в отсутствие синтеза АТР, но в то же время не эффективна в активном метаболическом состоянии. Циклоспорин А в концентрации 10 мкМ не оказывает существенного влияния на дыхание митохондрий в состоянии 4 и в разобленном состоянии, но на 18% ингибирует скорость дыхания в состоянии 3, что сопровождается снижением скорости окислительного синтеза АТР также на 18%. В присутствии циклоспорина А ТДК не влияет на исследуемые показатели дыхания и окислительного фосфорилирования.

Зависимость скорости дыхания митохондрий печени в состоянии 2 и в состоянии 4 от концентрации ТДК линейна. Это позволяет для характеристики активности ТДК использовать величину удельной активности (V_a) и коэффициент активности α .

Как показали проведенные исследования, P_i не оказывает влияния на активность ТДК (таблица 3). Олигомицин, в концентрации полностью ингибирующей окислительное фосфорилирование, не изменяет активность ТДК как в отсутствие, так и в присутствии P_i (таблица 3). В присутствии олигомицина и P_i АТР также не влияет на активность ТДК (таблица 3). Полученные данные свидетельствуют о том, что исследуемый эффект ТДК не связан с влиянием на F_0F_1 -АТР-синтазу и отличается от действия мембранотропных разобщителей.

Таблица 3 — Удельная активность (V_a) ТДК в митохондриях печени при различных экспериментальных условиях

Экспериментальные условия	V_a , нМ O_2 / мин на 1 мкМ ТДК
Без добавок ($n = 6$)	$14,9 \pm 0,6$
Олигомицин ($n = 4$)	$15,6 \pm 0,4$
P_i (состояние 2) ($n = 5$)	$16,8 \pm 1,0$
P_i (состояние 4) ($n = 4$)	$22,8 \pm 0,4^*$
$P_i + АТР$ ($n = 3$)	$15,4 \pm 0,4$
$P_i +$ олигомицин ($n = 3$)	$16,1 \pm 0,6$
$P_i +$ олигомицин + АТР ($n = 3$)	$15,1 \pm 0,5$

Примечание. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в разделе «Материалы и методы» и на рис. 5. Олигомицин, 2 мкг/мл; P_i , 5 мМ; АТР, 200 мкМ; АДФ, 200 мкМ, Нигерин 20 нМ. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3 - 6$).

* Различия между значениями удельной активности ТДК в состоянии 2 и в состоянии 4 статистически значимы, $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Проведенные исследования также показали, что способность ТДК стимулировать дыхание обращается при последующем добавлении к митохондриям циклоспорина А в высокой концентрации (рис. 5 б и з). В пользу обратимости эффекта этой

дикарбоновой кислоты свидетельствует и то, что стимуляция ТДК дыхания в состоянии 2 устраняется при добавлении к митохондриям ADP, т.е. при переходе их в состояние 3 и затем снова проявляется в состоянии 4. Исходя из этого, можно полагать, что стимуляция ТДК дыхания митохондрий без снижения мембранного потенциала не связана с нарушением этой дикарбоновой кислотой целостности внутренней мембраны, как это наблюдается при действии хлороформа (Chien and Brand, 1996).

Ранее уже отмечалось (Маркова и др., 1999), что действие ТДК на митохондрии похоже на действие десопрягающих агентов, которые, как полагают, переключают работу комплексов дыхательной цепи на холостой режим, или, говоря по-другому, осуществляют внутреннее разобщение (Van Dam et al., 1990; Para et al., 2006). Проведенные в настоящей работе исследования, позволившие исключить другие известные пути стимуляции дыхания митохондрий, свидетельствуют в пользу такого механизма действия ТДК. Можно предположить, что циклоспорин А, будучи нейтральным липофильным соединением, но в то же время имея полярные группы, способен формировать водородные связи в гидрофобной области мембраны с полярными группами мембранных белков. Возможно, что подобным образом циклоспорин А затрудняет взаимодействие ТДК с сайтами комплексов дыхательной цепи и, вследствие этого, препятствует переводу их в холостой режим. Существует мнение, что внутреннее разобщение комплексов дыхательной цепи отсутствует в условиях окислительного синтеза АТФ (Para et al., 2006). Полученные в настоящей работе данные, показывающие отсутствие влияния ТДК на коэффициент ADP/O , вполне согласуются с этой точкой зрения.

Результаты проведенных исследований позволяют говорить о том, что имеется общее в механизме действия моно- и дикарбоновых жирных кислот. По-видимому, составляющая разобщающего действия монокарбоновых жирных кислот, чувствительная к циклоспорину А, и разобщающее действие α,ω -диолевых кислот осуществляется по одному и тому же механизму внутреннего разобщения. Обращает на себя внимание то, что циклоспорин А в концентрации 10 мкМ практически полностью подавляет часть разобщающей активности монокарбоновых жирных кислот, не связанной с функционированием ADP/АТФ- и аспартат/глутаматного антипортеров, и разобщающую активность α,ω -дикарбоновых кислот. Следовательно циклоспорин А может быть использован как инструмент для оценки степени индуцированного этими моно- и α,ω -дикарбоновыми жирными кислотами внутреннего разобщения.

На рис. 6 приведена гипотетическая схема, объясняющая действие моно- и α,ω -дикарбоновых жирных кислот как индукторов внутреннего разобщения в митохондриях печени. Эта схема основывается на концепции локального сопряжения окислительного фосфорилирования в митохондриях (Yaguzhinsky et al., 2006; Para et al., 2006). Согласно этой концепции, в течение окислительного синтеза АТФ выбрасываемые комплексами дыхательной цепи протоны непосредственно передаются на ком-

плекс F_0F_1 -АТРсинтазу (рис 6, а). Часть протонов диффундирует в объемную водную фазу межмембранного пространства и возвращается обратно в матрикс путем пассивной утечки через внутреннюю мембрану. В этом случае монокарбоновые жирные кислоты могут усиливать пассивную утечку, действуя как разобщители-протонофоры при участии ADP/АТР- и аспартата/глутаматного антипортеров, в то время как α,ω -дикарбоновые кислоты не эффективны. Предполагается, что в отсутствии синтеза АТР протоны, минуя F_0F_1 -АТР-синтазу, возвращаются обратно к комплексам дыхательной цепи (рис 6, б). Этот процесс, рассматриваемый нами как внутреннее разобщение окислительного фосфорилирования, значительно усиливается с помощью моно- и α,ω -дикарбоновых жирных кислот и подавляется циклоспорином А.

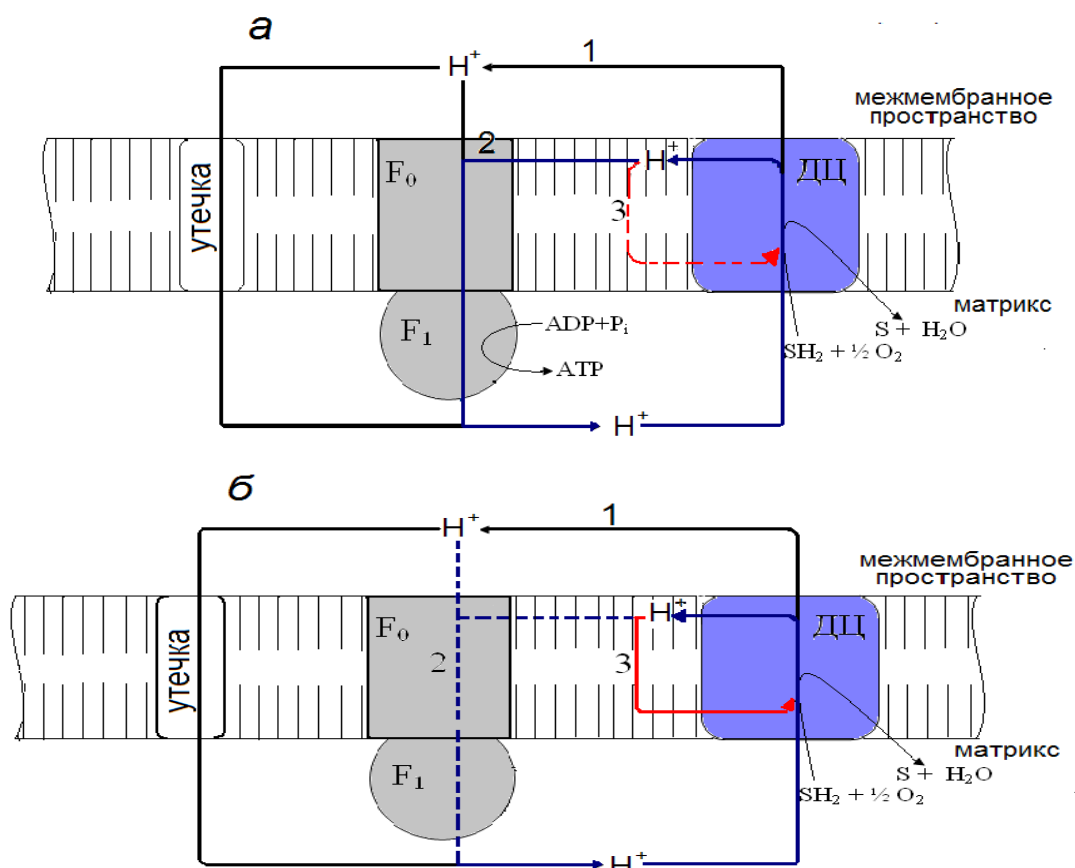


Рис. 6. Гипотетическая схема действия монокарбоновых жирных кислот (а) и α,ω -дикарбоновых жирных кислот (б) как индукторов внутреннего разобщения в митохондриях печени.

3.5. Исследование разобщающего действия пальмитиновой кислоты в митохондриях печени крыс различного возраста

Митохондрии печени месячных крысят массой 50 г. по сравнению с митохондриями печени взрослых крыс массой 250 г. имеют более высокую скорость дыхания как в контролируемом состоянии, так и в присутствии пальмитиновой кислоты и это различие в наибольшей степени обусловлено за счет составляющей разобщающей ак-

тивности не чувствительной к карбоксиатрактилату и глутамату (V_{Ins}) (Самарцев и др., 2004). Можно было бы полагать, что в митохондриях печени крысят составляющая разобщения V_{Ins} также будет полностью подавляться циклоспорином А. Однако нельзя исключить и то, что более высокие значения V_{Ins} в митохондриях печени крысят связаны с функционированием еще одной системы разобщения.

Как показано в таблице 4, скорость дыхания митохондрий печени месячных крысят как в контролируемом состоянии, так и в присутствии пальмитиновой кислоты превышает аналогичные показатели митохондрий печени взрослых крыс, что подтверждает опубликованные ранее данные (Самарцев и др., 2004). Разобщающее действие пальмитиновой кислоты в том и в другом случае эффективно подавляется карбоксиатрактилатором и аспаратом (таблица 6), что свидетельствует об участии в разобщении ADP/ATP- и аспартат/глутаматного антипортеров. Выше уже отмечалось, что полное подавление разобщающего действия пальмитиновой кислоты достигается при добавлении после карбоксиатрактилата и аспартата циклоспоринона А. В митохондриях печени месячных крысят полное подавление разобщающего действия пальмитиновой кислоты также достигается при последующем добавлении циклоспоринона А (таблица 6). Установлено, что в митохондриях печени месячных крысят ресопрягающие эффекты карбоксиатрактилата и аспартата меньше, а циклоспоринона А больше, чем в митохондриях печени взрослых крыс.

Таблица 4 — Сравнение скорости дыхания митохондрий печени крыс массой 250 г. и крысят массой 50 г. в присутствии пальмитата и при последующем добавлении карбоксиатрактилата, аспартата и циклоспоринона А

Добавки	Скорость дыхания (нмоль O_2 /мин на 1 мг белка)	
	Митохондрии крыс массой 250 г ($n = 6$)	Митохондрии крысят массой 50 г ($n = 6$)
Без добавок	$10,8 \pm 0,3$	$15,1 \pm 0,9^*$
Пал	$24,3 \pm 0,8$	$35,5 \pm 1,9^*$
Пал + Катр	$18,2 \pm 0,8$	$27,7 \pm 1,2^*$
Пал + Катр + Асп	$13,4 \pm 0,5$	$22,4 \pm 1,2^*$
Пал + Катр + Асп + ЦсА	$10,8 \pm 0,3$	$15,1 \pm 0,9^*$
Пал + Катр + Асп + ЦсА+ДНФ	$77,6 \pm 3,3$	$76,9 \pm 3,1$

Примечание. Условия опыта и состав среды инкубации описаны в экспериментальной части и на рис. 23. Пал – 30 мкМ пальмитиновой кислоты, Катр – 1 мкМ карбоксиатрактилата, Асп – 3 мМ аспартата калия, ЦсА – 10 мкМ циклоспоринона А, ДНФ – 50 мкМ 2,4-динитрофенола. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего.

* Различия между показателями митохондрий печени крыс массой 250 г и крысят массой 50 г статистически значимы, $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Для количественной оценки протонофорной разобщающей активности пальмитиновой кислоты использована величина её удельной разобщающей активности (V_U) состоящую из трех частей – чувствительной к карбоксиатрактилату, чувствительной к

глутамату (или аспартату) и нечувствительной ни к одному из этих реагентов (Самарцев и др., 2004). В настоящей работе, в связи с обнаруженным эффектом циклоспорина А подавлять нечувствительное к действию карбоксиатрактилата и глутамата (аспартата) разобщение, эта величина рассматривается как третья составляющая разобщения – чувствительная к действию циклоспорина А (V_{CsA}). Как видно из рис. 7, величины составляющих разобщающей активности пальмитата V_C и V_A приблизительно одинаковы в митохондриях печени взрослых крыс и крысят, в то время как величина составляющей разобщения V_{CsA} значительно больше в митохондриях крысят.

В следующих экспериментах, проведенных на митохондриях печени месячных крысят, циклоспорин А был добавлен непосредственно после внесения митохондрий. В этом случае циклоспорин А в концентрации 10 мкМ не влияет на дыхание митохондрий в контролируемом состоянии (в отсутствие синтеза АТФ и разобщителей) и при максимальной стимуляции дыхания 2,4-динитрофенолом, но приводит к снижению скорости дыхания в присутствии пальмитиновой кислоты и при последующем добавлении карбоксиатрактилата и аспартата на одну и ту же величину. Под влиянием циклоспорина А ресопрягающие эффекты карбоксиатрактилата и аспартата увеличиваются и в сумме достигают 100%.

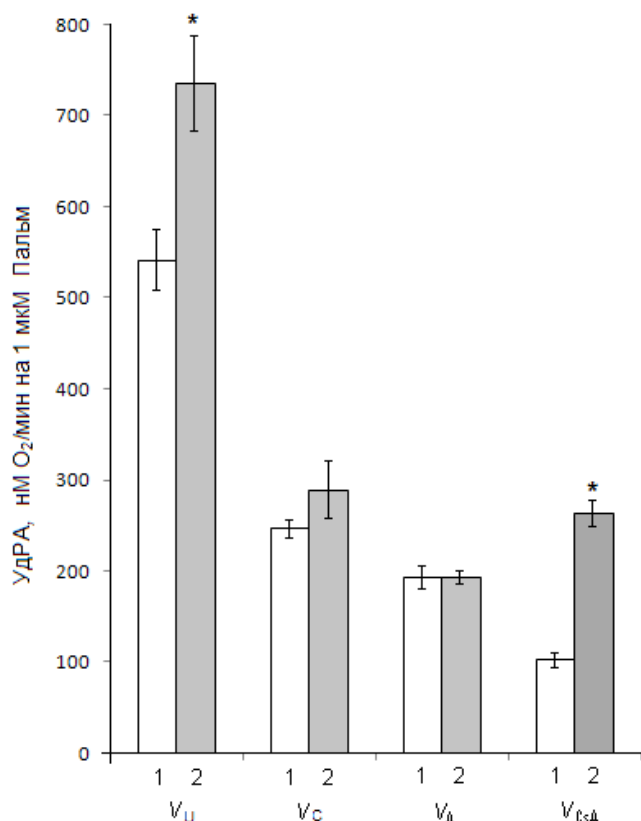


Рис. 7. Сравнение удельной разобщающей активности пальмитиновой кислоты (V_U) и ее составляющих частей: чувствительной к карбоксиатрактилату (V_C), чувствительной к аспартату (V_A) и чувствительной к циклоспорину А (V_{CsA}) в митохондриях печени крыс массой 250 г (1) и крысят массой 50 г (2). Условия опыта и состав среды инкубации описаны в примечании к таблице 6. Приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 6$).

* Различия между показателями митохондрий печени крыс массой 250 г. и крысят массой 50 г. статистически значимы, $p < 0,05$ (критерий Стьюдента).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в митохондриях печени месячных крысят разобщающая активность пальмитиновой кислоты больше, чем в митохондриях печени взрослых крыс, за счет составляющей разобщения, чувствительной к циклоспорину А. Следовательно активность жирных кислот

как внутренних разобщителей окислительного фосфорилирования в митохондриях зависит от возраста крыс – больше в митохондриях крысят, чем взрослых крыс.

ВЫВОДЫ

1. Циклоспорин А в концентрации 10 мкМ не оказывает влияния на дыхание митохондрий печени в состояниях 2 и 4, а также при максимальной стимуляции дыхания 2,4-динитрофенолом, но вызывает снижение скорости дыхания в состоянии 3, и скорости фосфорилирования ADP.

2. Циклоспорин А в концентрациях 5 и 10 мкМ ингибирует стимулированное пальмитиновой и лауриновой кислотами дыхание митохондрий печени как в отсутствие, так и в присутствии карбоксиатрактилата и глутамата (или аспартата).

3. Циклоспорин А концентрации 10 мкМ не влияет на мембранный потенциал митохондрий в присутствии жирных кислот при добавлении его после карбоксиатрактилата и глутамата.

4. α,ω -Тетрадекандиоловая кислота обратимо стимулирует дыхание митохондрий печени по механизму внутреннего разобщения окислительного фосфорилирования только в отсутствие синтеза АТФ. Стимулирующее действие α,ω -тетрадекандиоловой кислоты полностью устраняется циклоспорином А в концентрации 10 мкМ.

5. Активность пальмитиновой кислоты как внутреннего разобщителя окислительного фосфорилирования в митохондриях печени зависит от возраста крыс – больше в митохондриях печени месячных крысят, чем взрослых крыс.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Работы, опубликованные в ведущих рецензируемых научных журналах и изданиях, определенных ВАК:

1. Самарцев В.Н., Кожина О.В., **Рыбакова С.Р.** Циклоспорин А ингибирует протонофорную разобщающую активность лаурата в митохондриях печени // **Биологические мембраны**. – 2008. – Т. 25. – № 3. – С. 191–195. (Перевод: Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology. – 2008. – Vol. 2. – № 2. – P. 139–143).

2. Самарцев В.Н., Кожина О.В., **Рыбакова С.Р.** Зависимость разобщающей активности пальмитата в митохондриях печени от массы тела крыс различного возраста // **Журнал эволюционной биохимии и физиологии**. – 2010. – Т. 46. – № 2. – С. 164–166. (Перевод: Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology. – 2010. – Vol. 46. – № 2. – P. 198–201).

3. **Рыбакова С.Р.**, Дубинин М.В., Самарцев В.Н. Особенности активации свободного окисления в митохондриях печени α,ω -тетрадекандиоловой кислотой // **Биологические мембраны**. – 2013. – Т. 30. – № 1. – С. 30–39.

4. Самарцев В.Н., **Рыбакова С.Р.**, Дубинин М.В. Взаимодействие свободных жирных кислот с митохондриями в процессе разобщения окислительного фосфорилирования // **Биофизика**. – 2013. – Т. 58. – Вып. 3. – С. 481–487.

Статьи, тезисы докладов региональных, всероссийских и международных конференций:

1. Самарцев В.Н., **Рыбакова С.Р.**, Кожина О.В., Марчик Е.И. Циклоспорин А-чувствительное разобщающее действие жирных кислот в митохондриях печени без участия ионов кальция // Рецепция и внутриклеточная сигнализация: международная конференция (Пушино, 2–4 июня 2009 г.): сборник статей. - Пушино, 2009. – Т. 2. – С. 624–627.

2. **Рыбакова С.Р.**, Самарцев В.Н. Влияние циклоспорина А на индуцированное жирными кислотами дыхание митохондрий печени крыс различного возраста // Тринадцатые Вавиловские чтения. Глобализация. Глобалистика. Потенциалы и перспективы России в глобальном мире: материалы постоянно действующей Всероссийской междисциплинарной научной конференции с международным участием. – Йошкар-Ола, 2010. – С. 191–192.

3. **Рыбакова С.Р.**, Самарцев В.Н. Сравнительное исследование циклоспорин А-чувствительного кальций-независимого разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени крыс различного возраста // Актуальные проблемы экологии, биологии и химии: материалы Всероссийской конференции. – Йошкар-Ола: Мар. гос. ун-т, 2010. – Вып. 1. – С. 213–214.

4. Самарцев В.Н., Кожина О.В., Марчик Е.И., **Рыбакова С.Р.**, Шамагулова Л.В. Взаимодействие жирных кислот с митохондриями печени: механизмы и физиологическое значение // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине: сборник трудов первой международной научно-практической конференции, 23–26.11.2010 г. – СПб., 2010. – Т. 1. – С. 213–214.

5. Марчик Е.И., **Рыбакова С.Р.**, Самарцев В.Н. Транспорт ионов как фактор регуляции разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени // Биология – наука XXI века. 15-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пушино, 18–22 апреля 2011 г.): сборник тезисов. – Пушино, 2011. – С. 98.

6. Самарцев В.Н., Марчик Е.И., **Рыбакова С.Р.**, Чернядьева А.В. Изучение механизмов регуляции кальций-независимого разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени // Рецепция и внутриклеточная сигнализация: международная конференция (Пушино, 24–26 мая 2011 г.): сборник статей. – Пушино, 2011. – С. 715–718.

7. **Рыбакова С.Р.**, Самарцев В.Н. Влияние α,ω -тетрадекандикарбоновой кислоты на окислительное фосфорилирование в митохондриях печени // Актуальные проблемы экологии, биологии и химии: сборник материалов Всероссийской конференции. – Йошкар-Ола: Мар. гос. ун-т, 2011. – Вып.2. – С. 190–192.

8. **Рыбакова С.Р.**, Дубинин М.В., Самарцев В.Н. Циклоспорин А-чувствительная стимуляция дыхания митохондрий печени α,ω -тетрадекандикарбоновой кислотой без участия ионов кальция // Биология – наука XXI века. 16-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 16 – 21 апреля 2012 г.): сборник тезисов. – Пущино, 2012. – С. 192.

9. **Рыбакова С.Р.**, Самарцев В.Н. Особенности взаимодействия с митохондриями печени различных предельных жирных кислот, отличающихся длиной цепи // Актуальные проблемы экологии, биологии и химии: материалы конференции по итогам НИР БХФ за 2011.– Йошкар-Ола: Мар. гос. ун-т, 2012. – Вып. 3. – С. 34–35.

10. Самарцев В.Н., **Рыбакова С.Р.**, Дубинин М.В., Григорьева Л.В., Чернядьева А.В. Особенности взаимодействия свободных предельных жирных кислот различной длины цепи с митохондриями в процессе разобщения окислительного фосфорилирования // IV съезд биофизиков России 20-26 августа 2012 г. Симпозиум I «Физико-химические основы функционирования биополимеров и клеток»: материалы докладов. – Нижний Новгород, 2012. – С. 259.

11. **Рыбакова С.Р.**, Дубинин М.В., Иванова А.Е., Самарцев В.Н. Изучение механизмов активации свободного окисления в митохондриях печени α,ω -тетрадекандикарбоновой кислотой // Международная конференция молодых ученых. 22-24 октября 2012 г. «Экспериментальная и теоретическая биофизика '12»: сборник тезисов. – Пущино, 2012. – С. 93–94.

Список сокращений

- БСА – бычий сывороточный альбумин;
ДНФ – 2,4-динитрофенол;
ТДК – α,ω -тетрадекандикарбоновая кислота;
ТФФ⁺ – катион тетрафенилфосфония;
ФКФ – *n*-трифторометоксикарбонилцианидфенилгидразон;
EGTA – этиленгликоль - бис - (2-аминоэтиловый эфир) - N, N, N', N' - тетрауксусная кислота;
ADP – аденозин-5'-дифосфат;
ATP – аденозин-5'-трифосфат;
ADP/O – стехиометрический коэффициент, показывающий эффективность окислительного фосфорилирования (P/O, ATP/O);
HEPES – N-2- гидроксипиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота; буфер;
P_i – фосфат неорганический;
 $\Delta\Psi$ – разность электрических потенциалов на внутренней мембране митохондрий;
 ΔpH – разность концентраций ионов водорода по обе стороны внутренней мембраны митохондрий.